

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2005-000145

(43)Date of publication of application : 06.01.2005

(51)Int.Cl. C12N 1/20
A01N 63/00
C12N 1/16
//(C12N 1/16
C12R 1:645)
(C12N 1/20
C12R 1:38)
(C12N 1/20
C12R 1:07)

(21)Application number : 2003- 178489 (71)Applicant : KATAKURA CHIKKARIN CO LTD

(22)Date of filing : 23.06.2003 (72)Inventor : IKEGASHIRA YASUO
KINOOKA YUZO
NOGUCHI KATSUNORI

(30)Priority

Priority number : 2003109255 Priority date : 14.04.2003 Priority country : JP

(54) MICROORGANISM FOR CONTROLLING PLANT VIRUS, PLANT VIRUS-CONTROLLING AGENT COMPOSED OF THE SAME AND METHOD FOR CONTROLLING PLANT VIRUS BY USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a bio-material effective for blocking or preventing the infection of soil infective plant virus disease-suffered field, as a soil-disinfecting material or soil-improving agent substituting methyl bromide.

SOLUTION: The new microorganism having an ability to inactivate the plant virus and the method for inactivating the plant virus by using the same are provided. Also, the plant virus-controlling agent consisting of the microorganism, a protein-decomposing enzyme i.e. protease, an organic substrate, a porous substrate, a carbonized wood and/or alginate beads, and the method for controlling the plant virus by treating the seeds, leaves, roots and/or soil with the microorganism or a combination of the microorganism and the protease are provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 07.02.2006

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-145

(P2005-145A)

(43) 公開日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.CI.⁷
C 12N 1/20
A 01N 63/00
C 12N 1/16
 $\text{//}(C 12N 1/16$
C 12R 1:645)

F 1
C 12N 1/20
A 01N 63/00
A 01N 63/00
C 12N 1/16
C 12N 1/16

テーマコード(参考)
4 B 0 6 5
4 H 0 1 1
F
Z
Z

審査請求 未請求 請求項の数 9 ○ L (全 13 頁) 最終頁に統ぐ

(21) 出願番号 特願2003-178489 (P2003-178489)
(22) 出願日 平成15年6月23日 (2003.6.23)
(31) 優先権主張番号 特願2003-109255 (P2003-109255)
(32) 優先日 平成15年4月14日 (2003.4.14)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000240950
片倉チッカリン株式会社
東京都千代田区九段北一丁目13番5号
(72) 発明者 池頭 靖夫
茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片
倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内
紀岡 雄三
茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片
倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内
野口 勝憲
茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片
倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内
F ターム(参考) 4B065 AA15X AA41X AA72X AC20 CA47
4H011 AA04 BA02 BB21 BC18 BC19
BC20 DF04 DH10 DH11

(54) 【発明の名称】植物ウィルスを防除する微生物及び当該微生物からなる植物ウィルス防除剤並びに当該微生物を用いた植物ウィルスの防除方法

(57) 【要約】

【解決手段】本発明は、植物ウィルスの不活性化能を有する新規微生物及び当該微生物により植物ウィルスを不活性化する方法に関する。また、更には当該微生物と、タンパク質分解酵素プロテアーゼ、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物及び／又はアルギン酸ビーズとからなる植物ウィルス防除剤、並びに当該微生物もしくは当該微生物とプロテアーゼとの組み合わせで種子、葉、根及び／又は土壤に処理してなる植物ウィルスの防除方法に関する。

【効果】本発明によれば、難防除植物ウィルス汚染圃場などのウイルス病害の防除対策及び予防対策に有効に使用でき、従来にない、新しい土壤消毒法が確立し、ウイルス病害に対する臭化メチル代替剤としての利用が可能となる。また、減農薬による環境保全型農業が可能となる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

植物ウィルスの不活化能を有することを特徴とする微生物。

【請求項 2】

Pseudomonas sp. C-0176AV、*Bacillus* sp. BS-0017AV及び*Schizosaccharomyces* sp. M-0021AVから少なくとも一種選ばれる植物ウィルスの不活化能を有することを特徴とする請求項1記載の微生物。

【請求項 3】

請求項1又は2記載の微生物と、プロテアーゼ、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物及び／又はアルギン酸ビーズからなることを特徴とする植物ウィルス防除剤。 10

【請求項 4】

植物ウィルスの不活化能を有することを特徴とする微生物により植物ウィルスを不活化する方法。

【請求項 5】

請求項4記載の微生物が*Pseudomonas* sp. C-0176AV、*Bacillus* sp. BS-0017AV及び*Schizosaccharomyces* sp. M-0021AVから少なくとも一種選ばれることを特徴とする植物ウィルスを不活化する方法。 20

【請求項 6】

植物ウィルスの不活化能を有することを特徴とする微生物を種子、葉、根及び／又は土壌に処理してなることを特徴とする植物ウィルスの防除方法。

【請求項 7】

請求項6記載の微生物が*Pseudomonas* sp. C-0176AV、*Bacillus* sp. BS-0017AV及び*Schizosaccharomyces* sp. M-0021AVから少なくとも一種選ばれることを特徴とする植物ウィルスの防除方法。 30

【請求項 8】

プロテアーゼと、植物ウィルスの不活化能を有することを特徴とする微生物を栽培植物の種子、葉、根及び／又は土壌に処理してなることを特徴とする植物ウィルスの防除方法。

【請求項 9】

請求項8記載の微生物が*Pseudomonas* sp. C-0176AV、*Bacillus* sp. BS-0017AV及び*Schizosaccharomyces* sp. M-0021AVから少なくとも一種選ばれることを特徴とする植物ウィルスの防除方法。 40

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、植物ウィルスの不活化能を有する新規微生物及び当該微生物により植物ウィルスを不活化する方法に関する。また、本発明は、当該微生物と、タンパク質分解酵素プロテアーゼ、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物及び／又はアルギン酸ビーズとからなる植物ウィルス防除剤に関する。また更には、本発明は、当該微生物、又は当該微生物とプロテアーゼとの組み合わせで種子、葉、根及び／又は土壌に処理してなる植物ウィルスの防除方法に関する。本発明は農業及び園芸の分野において、植物ウィルス病の防除をして広く利用することができる。

【0002】**【従来の技術】**

農業生産において栽培されるタバコ、ピーマン、メロン、スイカ、キュウリ、トマトなどの各種作物は、タバコモザイクウイルス(TMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス(TMV-P)、トマトモザイクウイルス(TMV-T)、キュウリ緑斑モザイクウイ 50

ルス (C GMMV) 、メロンえそ斑点ウイルス (M N S V) 、レタスビックベインウイルス (L B V V) 、ピートえそ性葉脈黄化ウイルス (B N Y V V) などによって引き起こされる土壌伝染性のウイルスに罹病し、著しい被害を受けることが多い。これらの病原ウイルスは土壌、残渣・残根、雑草、種子に存在し、定植や作業時の管理作業によって伝播する。

【0003】

このような土壌伝染性のウイルス病害対策として、従来は臭化メチル剤の土壌くん蒸消毒により防除されてきた。しかし、本薬剤は国際規約によって2005年に全廃され、現在のところ植物ウイルス病防除における臭化メチル代替剤がない。これらのことから、本病害の土壌伝染を阻止するための技術開発が急務であり、必要不可欠なものである。また、
10 近年の環境問題への意識の高まりから減農薬への動きも大きくなってきている。そういうたた状況の中で、今後生物的な防除による環境保全型のウイルス病害防除が必要不可欠である。

その他、植物ウイルスの防除剤としては、アルギン酸ナトリウム剤や、シイタケ菌糸体培養抽出物（特公昭54-33994号）があるが、いずれも土壌消毒を目的として使用するものではなく、植物体の全面に漏れなく一様に散布する必要があり、また畠での効果はあまり高くない。

【0004】

【発明が解決しようとする問題点】

本発明は、臭化メチル代替の土壌消毒材および土壌改良材として、土壌伝染性の植物ウイルス病害汚染圃場の伝染を阻止する、あるいは予防対策を目的に、有効な生物素材を提供することを課題とする。また、本生物素材を用い、減農薬による環境保全型農業が可能となるような、植物ウイルス病害の生物的防除方法を提供することを課題とする。
20

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、根巣土壌、有機質肥料および堆肥に存在する微生物群からウイルス分解・不活化菌の検索を行い、土壌伝染性のウイルス病害を引き起こすTMVに対して高い不活化能を有する微生物を見出した。特に *Pseudomonas* 属の菌株 *Pseudomonas* sp. C-0176AV (寄託番号: FERM P-19252) 、 *Bacillus* 属の菌株 *Bacillus* sp. BS-0017AV (寄託番号: FERM P-19278) 、 *Schizosaccharomyces* 属の菌株 *Schizosaccharomyces* sp. M-0021AV (寄託番号: FERM P-19253) の3種の微生物が植物ウイルスの防除に有効であることを見出した。
30

【0006】

すなわち、本発明は、植物ウイルスの不活化能を有する新規微生物及び当該微生物により植物ウイルスを不活化する方法に関する。また、本発明は、当該微生物と、タンパク質分解酵素プロテアーゼ、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物及び／又はアルギン酸ビーズとかなる植物ウイルス防除剤に関する。また更には、本発明は、当該微生物、又は当該微生物とプロテアーゼの組み合わせで種子、葉、根及び／又は土壌に処理してなる植物ウイルスの防除方法に関する。
40

【0007】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の微生物としては、植物ウイルスの不活化能を有する微生物が用いられる。細菌として *Pseudomonas* 属、 *Bacillus* 属、 *Corynebacterium* 属等の細菌、放線菌として *Streptomyces* 属、 *Actinomyces* 属等の放線菌、酵母として *Saccharomyces* 属、 *Schizosaccharomyces* 属等の酵母、糸状菌として *Aspergillus* 属、 *Penicillium* 属等の糸状菌等、植物ウイルスの不活化能を有する微生物であれば、本発明の微生物として用いることができる。
50

【0008】

このうち、本発明の微生物としては、*Pseudomonas* sp. C-0176 AV、*Bacillus* sp. BS-0017AV、*Schizosaccharomyces* sp. M-0021AV（それぞれ、以下 C-176、BS-17、M-21とする）の活性が高く、有効に用いることができる。

C-176の菌学的特性は表1のとおりである。

【表1】

Pseudomonas sp. C-0176 AV の菌学的特性

(1) 形態	桿菌
(2) 細胞の長さ×幅(μm)	(1~3) × 0.5
(3) グラム染色	陰性
(4) 胞子の有無	なし
(5) 運動性の有無	あり
(6) 好気的条件での生育	+
(7) 嫌気的条件での生育	+
(8) 生育温度 (40°C)	+
(9) 生育温度 (4°C)	-
(10) 炭素源の資化性	
グルコース	+
マルトース	-
マンニトール	-
ガラクトース	+
アラビノース	-
(11) 窒素源の資化性	
L-セリン	+
L-アスパラギン酸	+
L-ヒスチジン	+
L-ロイシン	-

10

20

30

【0009】

本菌株は、上記菌学的特徴において桿状のグラム染色陰性で、運動性があり好気的・嫌気的条件で生育でき、グルコースから酸の生成を行うことからシュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に分類される。本菌の類縁種としてはシュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) あるいはシュードモナス・ピケッティー (*Pseudomonas pickettsii*) があげられるが、L-ロイシンを分解しないことからシュードモナス・ピケッティーにより近い種である。また、アラビノースを分解しない点やL-ヒスチジンを分解する点からシュードモナス・ピケッティーと異なり、本菌株はシュードモナス属の新菌種であると認定した [バージーズ・マニュアル オブ システマティク バクテリオロジー第1巻 (JOHN G HOLT et al., BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology)]。

40

【0010】

本菌株*Pseudomonas* sp. C-0176 AVは寄託番号：FERM P- 50

19252として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

本菌株は、YPMG寒天培地で培養して増殖することができる。用いられるYPMG培地は、寒天培地であっても、液体培地であっても使用することができる。YPMG培地を用いた培養は30℃で3日間行うことが好ましい。

BS-17の菌学的特性は表2のとおりである。

【表2】

Bacillus sp. BS-0017 AV の菌学的特性

(1) 形態	桿菌
(2) 細胞の長さ×幅(μm)	(1.5~5.5)×0.8
(3) グラム染色	陰性
(4) 孢子の有無	あり
(5) 運動性の有無	なし
(6) 好気的条件での生育	+
(7) 嫌気的条件での生育	±
(8) 最高生育温度	50℃
(9) 最低生育温度	10℃
(10) V-P反応	-
(11) ニュートリエント・プロスでの生育	+
(12) NaCl (5%~10%) 培地での生育	-
(13) エッグヨーク反応	-
(14) 炭素源の資化性	
D-グルコース	+
D-キシロース	+
L-アラビノース	+
D-マンニトール	-

10

20

30

【0011】

本菌株は、上記菌学的特徴において桿状で孢子を形成し、主として好気的条件で増殖する菌であることからバチルス属に分類される。本菌の類縁種としては、バチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) があげられるが、D-キシロース、L-アラビノースを分解する点からバチルス・ポピリエと異なり、本菌株はバチルス属の新菌種であると認定した。

40

本菌株*Bacillus sp.* BS-0017 AVは寄託番号：FERM P-19278として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

本菌株は、YPMG寒天培地で培養して増殖することができる。用いられるYPMG培地は、寒天培地であっても、液体培地であっても使用することができる。YPMG培地を用いた培養は30℃で3日間行うことが好ましい。

M-21の菌学的特性は表3のとおりである。

【表3】

Schizosaccharomyces sp. M-0021AV の菌学的特性

(1) 形態	楕円形、円筒形
(2) 増殖	分裂増殖
(3) 孢子の形態	球形、卵形
(4) 細胞の長さ (μm)	2.5~5.5
(5) 最高生育温度	40°C
(6) 最低生育温度	4°C
(7) 好気的条件での生育	+
(8) 嫌気的条件での生育	-
(9) 炭素源の資化性	
D-グルコース	-
マルトース	+
デキストリン	+

10

【0012】

本菌株は、上記菌学的特徴において楕円形、円筒形で分裂増殖し、球形、卵形の胞子を形成する菌であることからシゾサッカロマイセス属に分類される。本菌の類縁種としてはシゾサッカロマイセス・ジャポニクス (*Schizosaccharomyces japonicus*) あるいはシゾサッカロマイセス・ポムベ (*Schizosaccharomyces pombe*) があげられるが、D-グルコースを分解しないことから、本菌株はシゾサッカロマイセス属の新菌種であると認定した。
20

本菌株 *Schizosaccharomyces* sp. M-0021AV は寄託番号 : F E R M P - 1 9 2 5 3 として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

本菌株は、YPMG寒天培地で培養して増殖することができる。用いられるYPMG培地は、寒天培地であっても、液体培地であっても使用することができる。YPMG培地を用いた培養は30°Cで3日間行なうことが好ましい。
30

【0013】

本発明の微生物は、寒天培地又は液体培地を用いて、培養・増殖される。増殖された微生物は、白金耳等により採取、遠心分離等の操作により集菌して採取、あるいは培養液の状態として、植物ウィルスの防除又は植物ウィルス防除剤に用いることができる。

こうして培養・増殖して得られた本発明の微生物は、いずれか単独で用いることも2種以上を組み合わせて用いることもできる。本発明の微生物は、ウィルス不活化能を有し、本発明の微生物を種子、葉、根、土壤等に処理して植物ウィルスの防除効果が発揮される。たとえば、土壤中の残渣・残根に定着して土壤伝染を引き起こす植物ウィルスがある場合、これを分解し不活化することもできる。この処理方法としては、土壤への施用、育苗培土への添加、作物種子にバクテリゼーション処理、葉面散布、養液栽培における養液への添加、土耕栽培における株元への添加・灌注等をあげることができる。本発明の微生物処理により、栽培植物の植物ウィルス防除を行うことはもとより、植物ウィルス病害汚染圃場の伝染を阻止、あるいは予防対策として使用することができる。
40

【0014】

本発明の植物ウィルスの防除方法としては、上記のように微生物単独で処理することもできるが、タンパク質分解酵素プロテアーゼと組み合わせて処理すると、より植物ウィルスの防除効果は高まる。プロテアーゼとしては、酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ等があげられるが、酸性プロテアーゼを用いることが好ましい。プロテアーゼの処理の時期としては、本発明の微生物の処理と同時又は前処理として行うこと
50

ができ、処理の方法としては種子、葉、根、土壤等に上記微生物の処理方法と同様にして行うことができる。

【0015】

また、本発明の微生物は、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物等と組み合わせ、植物ウイルス防除剤とすることができます。有機質基質としては菜種粕、大豆粕、魚粕、コメヌカ、フスマ等があげられる。多孔質基質としてはゼオライト、インサイト、バーミキュライト等があげられる。こうして、本発明の植物ウイルス防除剤は、有機質基質、多孔質基質等と組み合わせることで効果が高まる。木質炭化物としては、バーク炭等があり微生物の住処となりやすい。

これら有機質基質、多孔質基質、木質炭化物の混合量は、植物ウイルス防除剤全量に対し 10 、0.1%～50%が望ましい。

【0016】

さらに、本発明の植物ウイルス防除剤には、プロテアーゼを組み合わせることができる。これにより、上述したように、より植物ウイルスの防除効果は高まる。また、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物等と組み合わせることにより相乗効果も期待することができる。

またさらに、本発明の植物ウイルス防除剤には、アルギン酸ビーズを組み合わせることができます。アルギン酸は、海藻などに含まれる天然の多糖類であり、アルギン酸を組み合わせることにより、本発明の微生物はこのアルギン酸ビーズに固定化され、微生物が作物根 20 圈および土壤へ優先的に定着して安定した効果が期待できる。また、アルギン酸ビーズは、生分解性であることから、環境汚染を引き起こすこともない。

【0017】

本発明の植物ウイルス防除剤に、本発明の微生物と組み合わされるプロテアーゼ、有機質基質、多孔質基質、木質炭化物及びアルギン酸ビーズは、目的に応じ1種を選択し、組み合わせることもできるが、2種以上選択して組み合せることもできる。

本発明の微生物及び当該微生物からなる植物ウイルス防除剤は、単独で使用することもできるが、適当な個体担体、液体担体、乳化分散剤などを用いて、粒剤、粉剤、錠剤、乳剤、水和剤等の任意の形状で使用できる。また、本発明の微生物及び当該微生物からなる植物ウイルス防除剤を無機質肥料、有機質肥料、除草剤、土壤等と共に使用し、肥料、土壤改良資材、育苗用培土等とすることができる。

30
30

【0018】

本発明の微生物及び植物ウイルス防除剤の防除するウイルスとしては、タバコモザイクウイルス (TMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス (TMV-P)、トマトモザイクウイルス (TMV-T)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV)、メロンえそ斑点ウイルス (MNSV)、レタスピックベインウイルス (LBVV)、ビートえそ性葉脈黄化ウイルス (BNYVV) 等によって引き起こされる土壤伝染性のウイルスの他に、昆虫媒介によるキュウリモザイクウイルス (CMV)、トマト黄化えそウイルス (TSWV) 等があげられる。

【0019】

【発明の実施の形態】

40

以下に本発明の実施態様を示すが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

実施例1～3 微生物を用いたウイルス不活化検定

(実施例1) C-176

YPD MG寒天 (酵母エキス3.0g、ペプトン5.0g、肉エキス1.0g、グルコース10g、寒天16g、蒸留水1.0リットル、pH7.0) 斜面培地に分離した菌株C-176をTMV-P汚染ピーマン根に接種して、各温度区(30℃、10℃)の暗条件下で1ヶ月間静置培養した。各温度区において菌株を接種しない以外は同様に培養した区を無処理区として設定した。培養後、リン酸緩衝液 (pH7.0) を添加して磨碎した。検定にはウイルスを接種することによって局部病斑を生ずるタバコ品種 (キサンチ・エヌシー) を用いた。検定用のタバコ品種は直径12cmの鉢で2ヶ月育成し、1区につき2鉢

50

、3葉（第5～第7葉）ずつ計6葉を用いた。それらの葉にカーボランダムを振掛けて、それぞれ磨碎した液を展開した葉の表の主脈を境とした半葉の半分（1／4葉）に各被検液（30℃、10℃）をそれぞれ塗抹接種し、もう半分に無処理液（30℃、10℃）をそれぞれ塗抹接種した。接種5日後、接種葉に現れた斑点の数を数え、次式によって病斑出現率を算出した。結果を表4に示した。

【数1】

$$\text{病斑出現率(%)} = \frac{\text{各温度培養試験区1/4葉の斑点数}}{\text{各温度培養無処理区1/4葉の斑点数}} \times 100$$

10

【表4】

30℃培養			10℃培養		
無処理	試験区	病斑出現率	無処理	試験区	病斑出現率
83	12	14	78	12	15

※ タバコ葉の第5～第7葉の計6葉における斑点数の平均値を示す

※※ 病斑出現率は無処理区を100とした時の値（%）

【0020】

(実施例2) BS-17

20

菌株C-176のかわりに菌株BS-17を用いる以外は、実施例1と同様の方法を行いウイルス不活化検定を行った。結果を表5に示した。

【表5】

30℃培養			10℃培養		
無処理	試験区	病斑出現率	無処理	試験区	病斑出現率
85	37	44	80	37	46

※ タバコ葉の第5～第7葉の計6葉における斑点数の平均値を示す

※※ 病斑出現率は無処理区を100とした時の値（%）

30

【0021】

(実施例3) M-21

菌株C-176のかわりに菌株M-21を用いる以外は、実施例1と同様の方法を行いウイルス不活化検定を行った。結果を表6に示した。

【表6】

30℃培養			10℃培養		
無処理	試験区	病斑出現率	無処理	試験区	病斑出現率
80	40	50	75	37	49

※ タバコ葉の第5～第7葉の計6葉における斑点数の平均値を示す

※※ 病斑出現率は無処理区を100とした時の値（%）

40

【0022】

(結果の概要)

30℃、10℃のいずれの温度区においてもC-176、BS-17、M-21とも無処理区に比較し、低い病斑出現率が確認された。すなわち、ウイルス汚染根（TMV-P汚染根）とこれら微生物とを培養した後、培養後の磨碎液をウイルス検定植物であるタバコ品種に接種した結果、C-176、BS-17、M-21に高いウイルス不活化能を有することが判明した。特にC-176によるウイルス不活化能が非常に高いことが判明した。

50

【0023】

実施例4 プロテアーゼとの組合せによる不活性化能

さらに、各ウイルス不活性化微生物（C-176、BS-17、M-21）と酵素処理の組み合わせによるウイルス不活性化能をみた。各微生物をTMV-P汚染ピーマン根に接種して、培養温度は30℃の暗条件下で、培養期間は酵素単独は2週間、酵素と微生物の組み合わせは各1週間培養で先に酵素で処理した。処理した酵素は1%濃度になるように蒸留水で希釈して添加した。菌株・酵素を接種及び添加しない以外は同様に培養した区を無処理区として設定した。培養後、リン酸緩衝液（pH 7.0）を添加して磨碎した。その磨碎した無処理区、酵素単独区、酵素+微生物区の3つの被検液を、実施例1と同様の方法で1枚のタバコ葉に1/4葉ずつ塗抹接種し、第5～第7葉の2株（計6葉）用いた。接種5日後、接種葉に現れた斑点の数を数え、病斑出現率を算出した。

結果を表7に示した。本発明によって、ウイルス不活性化微生物と酸性プロテアーゼなどの酵素処理との組み合わせにより、ウイルス不活性化能がより一層高まりほぼ完全に防除できた。

【表7】

処理方法	病斑出現率(%)
無処理区	100
酸性プロテアーゼ処理区	83
酸性プロテアーゼ+C-176処理区	0
酸性プロテアーゼ+BS-17処理区	18
酸性プロテアーゼ+M-21処理区	20

※病斑出現率は無処理区を100(%)としたときの数値とした

10

20

30

40

【0024】

実施例5 アルギン酸ビーズによる微生物の固定化

C-176をYPMG液体培地に懸濁し30℃で3日間培養した。培養後、YPMG液体培地を用いて菌密度を10⁸ CFU/gに調整した。調整液と等量のアルギン酸ナトリウムを調製液に混合し、十分攪拌した。混合液に一定圧力を加え、2%塩化カルシウム溶液に滴下した。得られたビーズは滅菌水で洗浄し、真空乾燥した。

【0025】

実施例6 アルギン酸ビーズを用いたウイルス防除適用試験（ノイバウエルポット試験）TMV-P汚染土（500g）に各微生物を固定化したアルギン酸ビーズを5.0%（w/w）添加してよく混合し、ノイバウエルポットに充填した。充填後の土壤に灌水して、30℃の一定条件に設定した人工気象器中に1ヶ月間静置した。その後、播種10日のピーマン苗（ニュー土佐ひかり）を定植して、1ヶ月間栽培したピーマン苗の最上葉を摘み取り、発病株を調べるためにELISA検定を行った。試験区は、TMV-P汚染していない土（非汚染土）、TMV-P汚染土に当該微生物を添加していない区（汚染土）、TMV-P汚染土に当該微生物を添加したアルギン酸ビーズの区で、1試験区あたり10株用いた。その結果、各微生物区ともにウイルス病の発病する株の割合が低下する傾向が認められた（表8）。特に、C-176区では発病の軽減効果が大きかった。

【表8】

試験区	発病率 (%)
非汚染土	0
汚染土	100
C-176	10
BS-17	30
M-21	50

ELISA 検定 : A_{405} 値 0.5 以上を陽性とした。

10

【0026】

実施例 7 有機質基質の評価

各有機質基質（菜種粕、大豆粕、魚粕、コメヌカ、フスマ）100 g をポリポットに入れ、水を25 mL 加えて121℃で30分間オートクレーブ滅菌した。滅菌後、あらかじめ YPMG 液体培地で培養しておいた各種微生物（C-176、BS-17、M-21）の培養液を4 mL (10^8 CFU/g) ずつ添加して30℃で培養を行い、培養21日目の菌数を調査した。結果を表9に示した。培養21日目で各微生物に共通して増殖量の大きかった資材は大豆粕、コメヌカ、フスマで、 10^8 オーダーであった。その他の資材では微生物の種類やアンモニアガスの発生などの影響で 10^7 オーダー以下になるものもあつた。有機質基質としては大豆粕>コメヌカ>フスマの順に好ましい結果となつた。

20

【表9】

資材	菌数 ($\times 10^7$ CFU/g)		
	C-176	BS-17	M-21
菜種粕	<1	<1	20
大豆粕	55	50	50
魚粕	<1	<1	<1
コメヌカ	50	45	20
フスマ	20	25	15

30

【0027】

実施例 8 多孔質基質及び木質炭化物の評価

大豆粕40 g と多孔質基質及び木質炭化物（ゼオライト、イソライト、バーカー炭、バーミキュライト）の各供試資材360 g をシナノパック（（株）シナノボリ製）へ入れ、水を100 mL 加え混合し、封をして121℃で30分間オートクレーブ滅菌した。滅菌後、あらかじめ YPMG 液体培地で培養しておいた各種微生物（C-176、BS-17、M-21）の培養液を4 mL (10^8 CFU/mL) ずつ添加して30℃で培養を行い、培養21日後の菌数を測定した。結果を表10に示した。バーカー炭以外のいずれも 10^7 オーダー以上増殖し、ゼオライト>バーミキュライト>イソライト>バーカー炭の順に菌数が多かつた。

40

【表10】

資材	菌数 ($\times 10^7$ CFU/g)		
	C-176	BS-17	M-21
ゼオライト	25	30	24
イソライト	7	12	5
パーク炭	<1	<1	<1
バーミキュライト	10	15	5

10

【0028】

実施例9 各種基質を用いた資材製造

実施例7、8で菌数の多かった有機質基質の大豆粕と多孔質基質のゼオライトを重量比で2:8に混合したもの1kgに、水を300mL添加して混合し、シナノパック（（株）シナノポリ製）に入れ封をして121℃で30分間オートクレーブ滅菌した。滅菌後、あらかじめYPMG液体培地で培養しておいた各種微生物（C-176、BS-17、M-21）の培養液を10mL（ 10^8 CFU/mL）ずつ添加して、30℃で1ヶ月間培養を行い、植物ウイルス防除資材を製造した（以下、防除資材と略す）。

20

【0029】

実施例10 防除資材を用いたウイルス防除適用試験（ノイバウエルポット試験）

TMV-P汚染土500gに各微生物の基質資材を10%（w/w）添加してよく混合し、ノイバウエルポットに充填した。充填後の土壤に灌水して、30℃の一定条件に設定した人工気象器中に1ヶ月間静置した。その後、実施例6と同様の方法で播種10日目のピーマン苗（ニュー土佐ひかり）を定植して、1ヶ月間栽培したピーマン苗の最上葉を摘み取り、発病株を調べるためにELISA検定を行った。試験区は、TMV-P汚染していない土（非汚染土）、TMV-P汚染土に各微生物の防除資材を添加していない区（汚染土）、TMV-P汚染土に各微生物を添加した防除資材の区で、1試験区あたり10株用いた。その結果、各微生物区ともにウイルス病の発病する株の割合が低下する傾向が認められた（表11）。しかし、防除資材の場合はC-176区ではアルギン酸ビーズなどの発病の軽減効果はなかった。

30

【表11】

試験区	発病率 (%)
非汚染土	0
汚染土	90
C-176	40
BS-17	20
M-21	30

40

ELISA検定； A_{405} 値0.5以上を陽性とした。

【0030】

【発明の効果】

実施例による根圈土壤、有機質肥料および堆肥に存在する微生物群から選抜された植物ウイルス不活性能を有する微生物は、高いウイルス防除効果を示した。さらには、プロテアーゼと当該微生物との組合せ処理によって、相乗的に非常に高いウイルス防除効果を示した。これらのことにより、本発明の微生物及び当該微生物からなる植物ウイルス防除剤は

50

、難防除植物ウイルス汚染圃場などのウイルス病害の防除対策及び予防対策に有効に使用できることがわかった。本発明により従来にない、新しい土壤消毒法が確立し、ウイルス病害に対する臭化メチル代替剤としての利用が可能となる。また、減農薬による環境保全型農業が可能となる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.'

F I

テーマコード(参考)

(C 1 2 N 1/20 C 1 2 R 1:645

C 1 2 R 1:38) C 1 2 N 1/20 E

(C 1 2 N 1/20 C 1 2 R 1:38

C 1 2 R 1:07) C 1 2 N 1/20 E

C 1 2 R 1:07